テクニカルレター

高速原子衝撃イオン化質量分析法における精密質量測定用標準物質の最適化

原 律子¹, 坂部千賀子², 大和田智彦³, 山口健太郎^{®1}

Optimization of the internal calibrant for exact mass measurements by FAB-MS

Ritsuko HARA¹, Chikako SAKABE², Tomohiko OHWADA³ and Kentaro YAMAGUCHI¹

¹ Chemical Analysis Center, Chiba University, 1-33, Yayoicho, Inage-ku, Chiba-shi, Chiba 263-8522

² School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, 5-9-1, Sirogane, Minato-ku, Tokyo 108-8641

³ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033

(Received 9 January 2004, Accepted 23 March 2004)

In an exact mass measurement by fast-atom bombardment mass spectrometry (FAB-MS), a couple of calibrant ion peaks were selected to calibrate the target ion. The target ion peak should be located between these two calibrant ion peaks on the mass spectrum. Although polyethyleneglycols, cesium iodide and "Ultramark" have been used as promising calibrants, it is generally difficult to obtain the desired ion intensity and mass number using these reagents. In this report we describes the optimization of the internal calibrant in both the positive and negative ionization modes. As a result, the effective ratio of the mixed calibrant was derived. The intensity of the ion signal was also improved by using these mixtures. The optimized calibrant expands the mass region from m/z 600 to 3000 while maintaining with even higher precision.

Keywords : mass spectrometry; high resolution; internal calibrant; ultramark; poly ethyleneglycol.

1 緒 言

高速原子衝撃イオン化質量分析法 (FAB-MS) の精密質量測定ではサンプルのイオンピークを分子量既知である標準物質の 2 本のイオンピークで挟み質量較正を行う。標準物質としては各種の polyethylene glycol (PEG), ヨウ化セシウム (CsI), ultramark (perfluoroalkyl phosphazine, FAB-MS の質量較正用物質) 等が使用されている。しかし、これらの標準物質はイオンピークの出現範囲やイオンピーク強度が異なり、どのような標準物質を用いるかは測定者の経験や勘に頼るところが大きい。そこで著者らは目的の

分子量にあった適切な標準物質選定を容易に行うため陽イオン測定, 陰イオン測定時の各種標準物質の混合比等調製法について詳しく検討を行った。

2 実 験

2.1 装 置

JMS-HX110 (電場-磁場型二重収束質量分析計, 日本電子製) 及び JMS-700 (磁場-電場型二重収束質量分析計, 日本電子製) を用いた。衝突ガスはキセノンガス, 加速電圧は 10 kV (陽イオン, 陰イオン測定), 8 kV (陰イオン測定), 分解能 5000, 精密質量測定は電場スキャンでデュアルターゲット法及び引き抜き法により行った。

2.2 検討法

PEG $\{H(OCH_2CH_2)_nOH\}$ は 44 u おきにピークが現れ PEG200, PEG300, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG1540

¹ 千葉大学分析センター: 263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33

² 北里大学薬学部化学系共有機器室: 108-8641 東京都港区白金 5-9-1

³ 東京大学大学院薬学系研究科: 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

等が標準物質としてよく用いられる。精密質量測定に有効なイオンピークは平均分子量を中心に山型に 10 本程度出現する。イオンピークの相対強度は PEG200 が最も強く平均分子量が大きくなるにつれて弱くなり、PEG600 は PEG200 の約 40 分の 1 となる。PEG1000, 1540 は常温では固体のため、FAB-MS 測定では matrix 等に溶解させる必要がある。今回は PEG200, PEG300, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG1540 について分子量 3000 まで検討を行った。実験の方法としては各種の PEG に他の PEG, m-ニトロベンジルアルコール (NBA), NaCl を混合比を変えて混ぜ合わせ陽イオンモード、陰イオンモードで低分解能測定を行い、それぞれの分子量領域で最もイオンピーク強度が強く、イオンピークの出現範囲が広くなるものを選択した。

CsI は陽イオン測定時にはセシウムの m/z 133 のイオンピークを先頭に 260 u おきにイオンピークが出現し、陰イオン測定時にはヨウ素の m/z 127 を先頭に 260 u おきにイオンピークが出現する。陽イオン、陰イオン測定時共に分子量 5000 前後でもイオンピークが観測されるので、高質量領域の精密質量測定に用いられる。しかし、通常は CsI を水に溶解し測定を行うが、測定中にイオンピーク強度が下がり測定ができなくなるという現象が頻繁に起こり、調製にはかなりの熟練が必要である。そこで安定なイオンピークを得るために CsI に水、各種の PEG, NBA を混合して検討を行った。

ウルトラマークは分子量 1000 前後の陰イオン測定に通常単独で用いられるが、PEG200 や NBA 等を混合してイオンピーク強度が大きくなるかどうか検討した。その他として PEG600 sulfate や NaI についても検討した。

検討の結果 PEG200 や NBA を他の標準物質と混合すると、混合の割合によっては標準物質を単独で用いるよりもイオンピーク強度を増大させる効果のあることが分かった。NBA を用いた場合は NBA が matrix の働きを兼ねるので、精密質量測定法の中の混合法にも応用できる。更に標準物質に NaCl を添加して生成した Na 付加イオンは標準物質そのものよりもイオンピーク強度が増大する場合があることを見いだした。また、Na 付加イオンが生成しなくてもイオンピーク強度が増大する場合もあった。なお、混合の割合はすべて体積比で表した^{1)~8)}。

3 結 果

3.1 陽イオン測定時の標準物質

分子量 700 までの範囲では、PEG200 + PEG400 を体積比が 1 : 1 になるように調製した場合、PEG400 を単独で用いるよりもイオンピーク強度が 2 倍になり、イオンピーク出現範囲も m/z 150 ~ 700 で PEG200, PEG400 を単独で用いるよりも広くなった。更にイオンピークの強度が広

範囲にわたって均一になり標準物質として非常に有用である。

分子量 1000 まででは、PEG200 + PEG600 = 10 : 3 の割合で混合した標準物質は PEG600 単独に比べ相対強度が約 2 倍となった。測定可能範囲は m/z 150 ~ 900 である。NBA + PEG600 = 10 : 1 のときの相対強度は PEG600 単体に比べ約 4 倍となり測定可能範囲は m/z 400 ~ 900 である。NBA + PEG600 = 10 : 0.5 に NaCl を加えて Na 付加イオンを生成させた場合、測定可能範囲は m/z 450 ~ 1000 である。NaCl は試料導入用プローブのターゲット上で 0.1 N 水溶液を約 0.1 μ l あるいは直径約 0.2 mm の結晶を 1 粒加える (NaCl の代わりに HCOONa や NaI を用いてもよい。以下同様)。相対強度は PEG600 単体に比べ約 20 倍となった。出現するイオンピークは Na 付加イオンのため精密質量測定時には PEG + Na 用のキャリブレーションテーブルを用いる。

分子量 1500 まででは、PEG200 + PEG1000 = 10 : 0.5 のときに測定可能範囲は m/z 700 ~ 1300 である。イオンピークの相対強度は PEG600 に比べ約 1/2 である。NBA + PEG1000 = 10 : 0.5 に NaCl を添加した場合、測定可能範囲は m/z 800 ~ 1400 である。PEG600 に比べ相対強度は約 2 倍である。精密質量測定時には PEG + Na 用キャリブレーションテーブルを用いる。

分子量 2000 まででは、NBA + PEG1540 = 10 : 2 に NaCl を添加したときの測定可能範囲は m/z 1300 ~ 1900 である。相対強度は PEG600 とほぼ同じである。精密質量測定時には PEG + Na 用キャリブレーションテーブルを用いる。

分子量 3000 まででは、ターゲット上で直径約 0.1 mm の CsI の結晶 5 ~ 6 粒を約 0.5 μ l の水に溶解する。測定可能範囲は m/z 200 ~ 2900 である。十分な感度を得られない場合は陰イオン測定時の調製法として 3.2 で述べる方法と同様に PEG200 を用いるとよい。今回は分子量 3000 まで検討を行ったが、実際には分子量 5000 まで測定が可能である。陽イオン精密質量測定用の標準物質一覧を Fig. 1 に示す。

3.2 陰イオン測定時の標準物質

分子量 700 まででは、PEG200 + PEG400 = 1 : 1 のときに測定可能範囲は m/z 100 ~ 600 である。ピークの相対強度は陽イオン測定時の PEG200 + PEG400 = 1 : 1 に比べ約 1/20 である。一般に陰イオン測定は陽イオン測定に比べイオンピーク強度が弱くなる。

分子量 1000 まででは、PEG600 + NaCl のときに測定可能範囲は m/z 150 ~ 800 である。PEG600 のみではイオンピーク強度が弱く測定には適さない。NaCl を加えても Na や Cl の付加イオンの影響がないため、精密質量測定時に

Fig. 1 Internal calibrant for positive ion mode

1) Mass range suitable for exact mass measurement and relative intensity of corresponding ion peaks are represented by the length and the thickness of each rectangular. 2) The mixing ratio is defined as the volume ratio. 3) These internal calibrants were available for both the dual target and the alternating method. The internal calibrant including NBA can be used for the mixing method.

は PEG のキャリブレーションテーブルをそのまま用いる。PEG600 + PEG200 = 3 : 7 では測定可能範囲は m/z 500 ~ 800 である。PEG600 に NaCl を添加した場合に比べピーク強度は約 2 倍になった。PEG600 sulfate $\{H(OCH_2CH_2)_nSO_4\}$ は 44 u おきにイオンピークが出現する。PEG600 sulfate はそのままではイオンピーク強度は弱いですが、NaCl を添加すると強くなる。NaCl を添加しても Na や Cl の付加イオンの影響はなく、PEG600 sulfate 用のキャリブレーションテーブルがそのまま利用できる。測定可能範囲は m/z 500 ~ 800 である。ピークの相対強度は PEG600 + PEG200 = 3 : 7 に比べて約 1/5 である。

分子量 1300 までは PEG1000 + PEG200 = 3 : 7 の場合、測定可能範囲は m/z 700 ~ 1300 である。

分子量 1700 までは、Ultramark + PEG200 = 1 : 1 の場合に測定可能範囲は m/z 1000 ~ 1700 である。Ultramark を単体で用いるよりもイオンピーク強度は約 7 倍になった。

分子量 3000 までは、ターゲット上で直径約 0.1 mm の CsI の結晶 5 ~ 6 粒を PEG200 + H₂O を 3 : 7 に混合したもの約 0.5 μ l に溶解させると、ピークの相対強度は CsI を水に溶解した場合に比べ約 100 倍と劇的に大きくなった。測定可能範囲は m/z 200 ~ 2900 である。CsI 水溶液をターゲットに塗布しイオン源に導入して水分を蒸発させた

後、取り出したターゲット上に PEG200 を塗布しても同様の効果が得られる。今回は分子量 3000 まで検討を行ったが、実際には分子量 5000 まで測定が可能である。

その他としてはターゲット上で直径約 0.1 mm のヨウ化ナトリウム (NaI) を 5 ~ 6 粒に PEG200 + H₂O = 1 : 1 を約 0.5 μ l 加えて溶解させる。測定可能範囲は m/z 200 ~ 2000 である。NaI はヨウ素のイオンピーク m/z 127 をスタートに 150 u おきに出現する。NaI のイオンピークは同位体がないためにシンプルで分かりやすいこと、イオンピークの間隔が 150 u と CsI の約 2 分の 1 であることから CsI と同様に標準物質として非常に有用であると考えられる。陰イオン精密質量測定用の標準物質一覧を Fig. 2 に示す。

4 精密質量測定例

今回検討した標準物質を用いて行った精密質量測定例を Table 1 に示す。デュアルターゲット法では片面に試料、反端面に標準物質を塗布したデュアルターゲットを用い初めに試料を 2 ~ 6 回スキャンし、次に標準物質を 2 ~ 3 回スキャンする。そして再び試料に戻して同じ操作を 2 ~ 3 回繰り返した。精密質量の計算は隣接する標準物質と試料の組み合わせを用い、イオンピーク強度が弱い場合は必要に応じてマスペクトルを積算した。陰イオン精密質量測

Fig. 2 Internal calibrant for negative ion mode

1) Mass range suitable for exact mass measurement and relative intensity of corresponding ion peaks are represented by the length and the thickness of each rectangular. 2) The mixing ratio is defined as the volume ratio. 3) These internal calibrants were available for both the dual target and the alternating method. The internal calibrant including NBA can be used for the mixing method.

Table 1 High resolution measurement

	Sample	Formula	Exact.mass (<i>m/z</i>)	Measured (<i>m/z</i>)	Error/ ppm
Positive ion mode	A ^{a)c)}	C ₆₄ H ₃₈ N ₈	938.4784	938.4790	+ 0.6
	B ^{a)c)}	C ₆₆ H ₁₁₉ N ₆ O ₄	1059.9293	1059.9286	- 0.7
	C ^{b)d)}	C ₁₁₀ H ₁₁₆ O ₂₂ Na	1811.7856	1811.7887	+ 1.7
Negative ion mode	D ^{b)c)}	C ₉₂ H ₁₁₀ N ₄ O ₃₂	1782.7103	1782.7115	+ 0.7
	E ^{b)c)}	C ₁₁₂ H ₁₄₀ N ₄ O ₃₆ Fe	2172.8597	2172.8599	+ 0.1

Measurement conditions— a) Internal calibrant: PEG200 + PEG1000 = 10 : 0.5; b) Internal calibrant: CsI dissolved in PEG200 + H₂O = 3 : 7; c) Mass spectrometer and method: JMX-HX-110 by the dual target method; d) Mass spectrometer and method: JMX-700 by the alternating method.

Accelerating voltages were adjusted to be 10 kV in positive ion mode and 8 kV in negative ion mode to avoid discharge during ionization.

定をデュアルターゲット法で行った試料 D の全イオン量の推移及びマススペクトルを Fig. 3 に示す。標準物質と試料の組み合わせから計算された測定結果は、1782.7115 (3 回) と 1782.7031 (1 回) であった。試料 C の陽イオン精密質量測定は引き抜き法を用いた。精密質量計算は標準物質 (CsI を PEG200 + H₂O = 3 : 7 に溶解) と試料 C のマススペクトルをそれぞれ積算して平均化した後に行った。

5 結 言

標準物質は単体で用いるよりも他の標準物質等と混合するとピーク強度が増す例を多数見いだした。そしてこれら

の標準物質を一覧図にまとめたことで、従来は経験と勘に頼っていた標準物質の選択が非常に簡単に行えるようになり、精密質量測定の能率が飛躍的に向上した。また、混合比を定めたことによって、より強いイオンピークを得るためターゲット上に多く塗りがちな標準物質を最低限の量にとどめることができた。その結果、イオン源の汚れが減りイオン源洗浄の回数を減らすことが可能となった。なお、測定に際しては使用頻度の高い標準物質はあらかじめ多めに調製しておき、その低分解能マススペクトルを手元に用意しておくことと便利である。

Fig. 3 Exact mass measurement of sample D in negative ion mode
The ion peak (*) was used for exact mass measurement. Five ion peaks adjacent to the peak (*) in the right were originated from its isotopes.

文献

- 1) 日本電子株式会社: '96 JEOL 分析機器ユーザーズミーティング-MS-資料; "MS 測定上の留意点 VII", (1996).
- 2) 日本電子株式会社: '96 JEOL 分析機器ユーザーズミーティング-MS-資料; "EI, CI, FAB, FD の上手な使い方", (1996).
- 3) 日本ウォーターズ株式会社: "The future of LC/MS", (2003).
- 4) J. M. Gilliam, P. W. Landis, J. L. Occolowitz: *Anal. Chem.*, **56**, 2285 (1984).
- 5) L. J. Goad, M. C. Prescott, M. E. Rose: *Organic Mass Spectrometry*, **19**, No2, 101 (1984).
- 6) M. M. Siegel, R. Tsao, S. Oppenheimer, T. T. Chang: *Anal. Chem.*, **62**, 322 (1990).
- 7) L. Jiang, M. Moini: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **3**, 842 (1992).
- 8) K. Yamaguchi, S. Sakamoto, T. Imamoto, T. Ishikawa: *Anal. Sci.*, **15**, 1037 (1999).